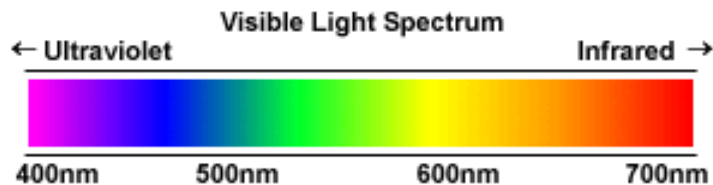
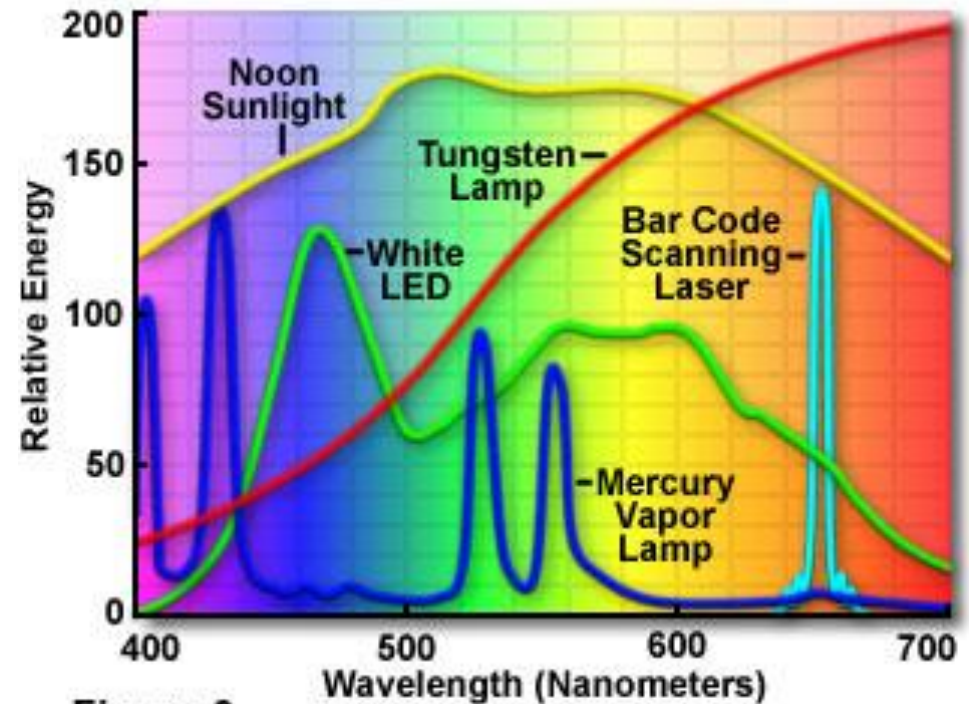
Lâmpadas e laseres

Iluminação de amostras no microscópio

Luz solar ➡ espectro bem conhecido, e bem focalizado porém irreprodutível, imprevisível e incontrolável !

Parâmetros a serem considerados na iluminação:

1. **Estabilidade e confiabilidade**: para experimentos de 3D ou 4D: durante muitas horas e durante os intervalos

2. **Qualidade do feixe de luz**: a qualidade ópticas do feixe de luz determina a precisão da excitação de nosso 'probe'. EM DIC, por exemplo, irregularidade através do campo pode resultar em um BG que talvez não possa ser distinguido do sinal da amostra. A qualidade do feixe também determinará quão bem ela poderá ser focalizada em nossa amostra.

   Idealmente nossa fonte deve prover iluminação uniforme através de toda a abertura numérica (NA) do condensador. Na prática, com lâmpadas de Arco (Hg/Xe) isso não ocorre mas pode ser corrigido com um expansor de feixe.

3. Ruído: Para rápida aquisição de imagens, ou quando baixos níveis de iluminação são necessários, ruído (variações na potência) reduz contraste e resolução. Sinais de baixa freqüência podem afetar a aquisição de sinais biológicos. **Flutuações de ruído são indesejáveis.**

4. Comprimento de Onda (λ) : 3 fatores:

1) Variação de cor/tempo, visualização do probe c/ tempo não deve ser variável;

2) Faixas espectrais disponíveis e;

3) Intensidade nestas faixas: para escolha da fonte de iluminação adequada ao probe, mediante uso de filtros.

5. Brilho: além da intensidade em determinado a potência final da fonte de iluminação pode ser importante para determinar a qualidade de iluminação em sistemas de point-scanning.

6. Método de envio e alinhamento: a qualidade de luz que incide na amostra é o que realmente conta. Portanto coleção, filtragem e focalização devem ser adequados e otimizados.

7. Custo e segurança na operação: o custo vai ser determinado por n fatores, tempo de uso, re-condicionamento, etc. **Segurança** na operação e manutenção deve ser sempre observada (laseres e Hg).

Lâmpadas de Tungstênio (W) e Haletos

Incandescent Light Sources

(a) (b) (c) (d) (e) (f)

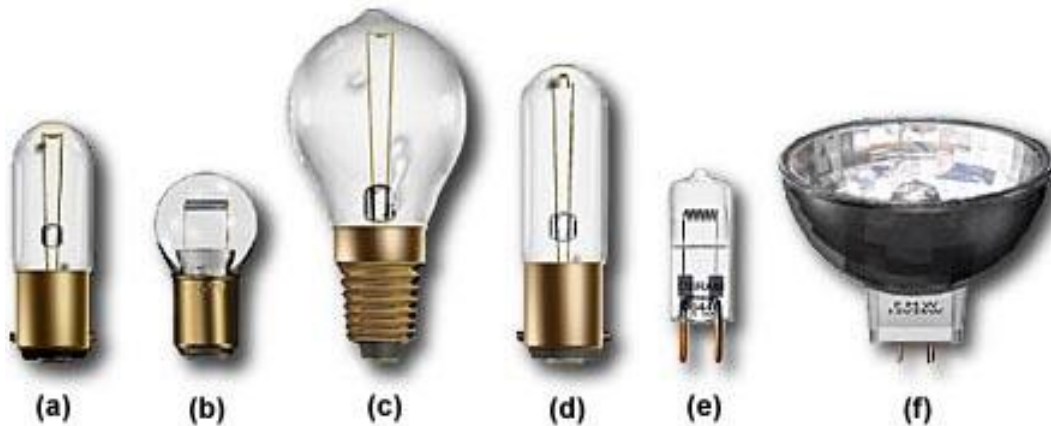
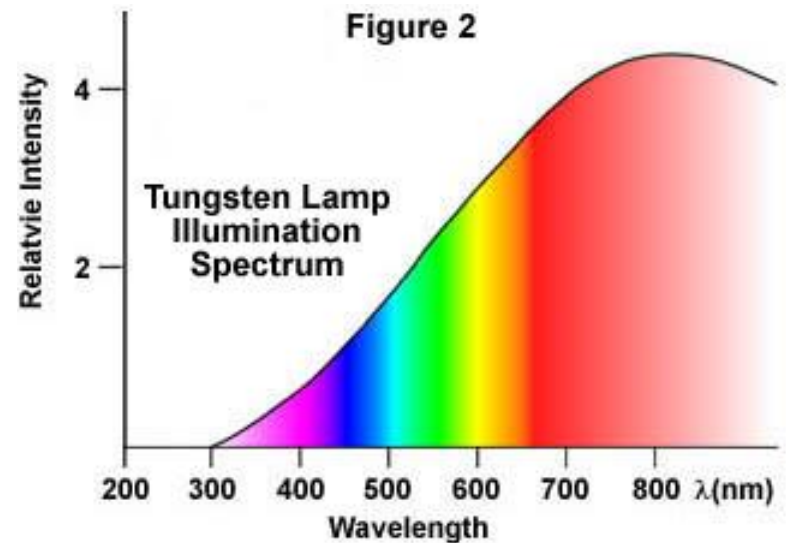



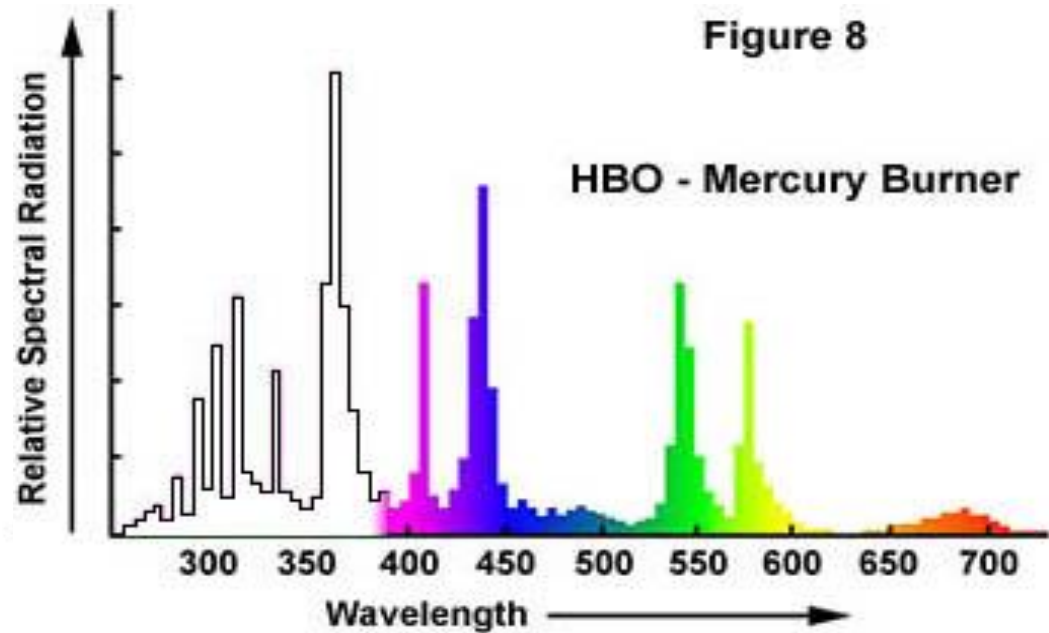
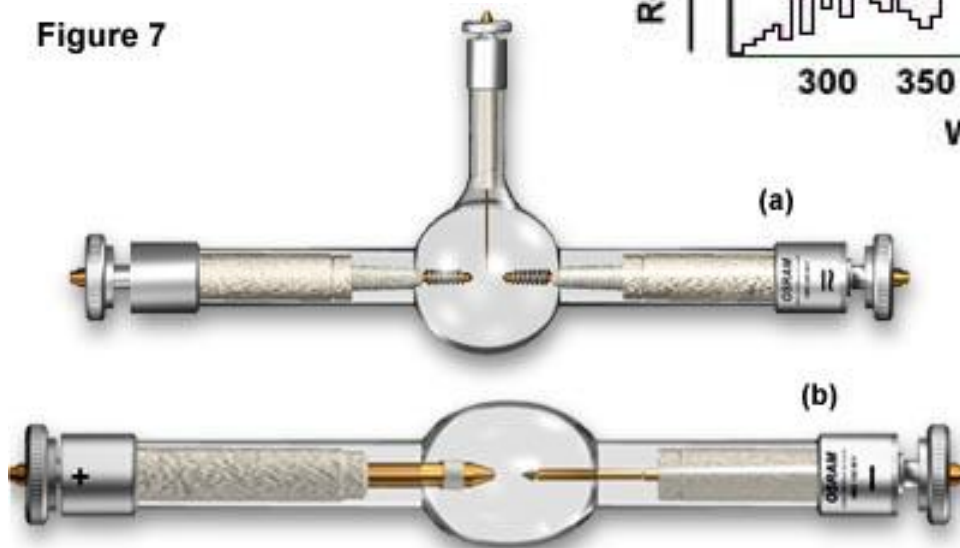
Figure 3

A luz é gerada por átomos excitados pelo filamento aquecido (num ambiente de gás inerte e baixa pressão) que se desprendem do filamento e incidem no envelope de vidro. Neste envelope, de quartzo impregnado com haletos (Br, I) estes, combinados com **W** evaporado, redepositam o **W** no filamento e regenerando o haleto, aumentando a estabilidade e tempo de vida. Lâmpadas chamadas de **halogênio** têm estes elementos misturados ao gás.

Estabilidade e confiabilidade: adequadamente utilizadas, são extremamente estáveis e adequadas p/ luz visível.

Qualidade do feixe. Baixa, sem colimação (raios não paralelos).

Ruído: Baixo, desde que fonte seja estabilizada
Intensidade: Adequada para métodos de contraste de rotina (campo claro, contraste de fase e DIC).
λ : contínuo entre 300 e 700nm. Intensidade baixa em λ curtos, sendo inadequada para excitação de fluorocromos.
Método de envio e alinhamento: Geralmente é enviada à amostra através de um coletor de vidro, um condensador e até Köhler; coleção, filtragem e focalização devem ser adequados e otimizados.
Custo baixo, dura 50-100 horas.
Operação-Segurança: Não deve ser manuseada diretamente, **e somente quando fria**. Se quartzo é tocado com dedos, deve ser limpo c/ álcool e seco para evitar contaminação que reduz o tempo de vida da lâmpada.

Lâmpadas de Arco (Arc lamps) - HBOs

Princípio da geração de luz: utilizam descarga entre dois eletrodos para excitar Hg ou Xe átomos que então emitem um espectro característico de luz. Estas lâmpadas emitem luz quando iniciadas com uma alta voltagem seguida de corrente constante.

Estabilidade e confiabilidade: são menos estáveis que W lamps, pela rápida resposta às flutuações na potência aplicada. São sempre ativadas c/ transformador DC que reduz ruído e alinhamento no soquete/câmara sem vibração garante vida mais longa. **A performance decai muito se lâmpada é desligada e re-ligada ainda quente (esperar pelo menos 15 minutos p/ esfriar).**

Qualidade de Feixe. Feixe pequeno que geralmente não ilumina todo o campo: em geral tem expansor de vidro no housing.

Ruído: em geral baixo, depende da fonte de DC. Aumenta c/ tempo.

λ: tem espectro constante de 300 a 700nm, e picos no IR. Hg tem mais emissão no UV.

Brilho: Hg (100 W) 3/4x > Xe (75w)

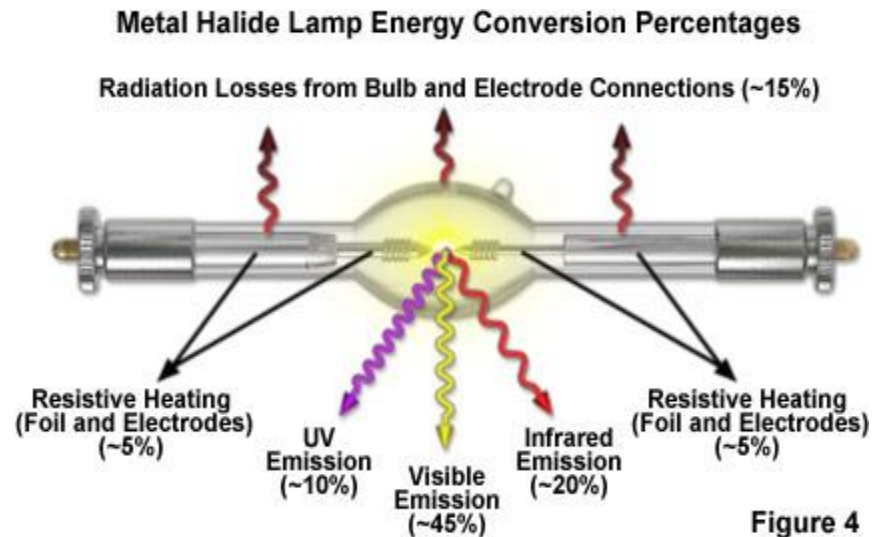
Método de envio e alinhamento: a qualidade de luz que incide na amostra é o que realmente conta. Filtros de IR e defocuse para aumentar área de iluminação: alinhamento é importante.

Custo: approx US$ 1 por hora de uso, ~200 horas de uso.

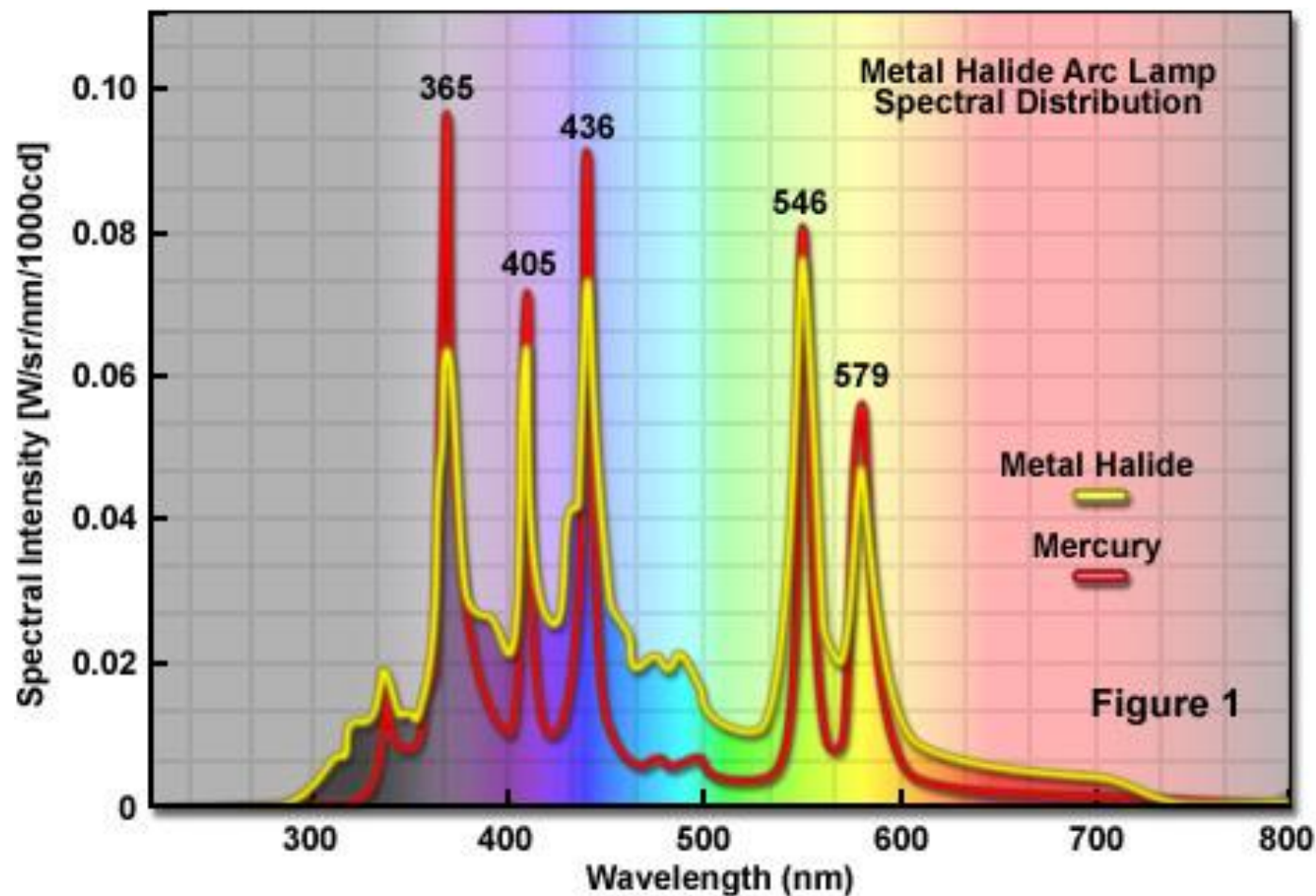
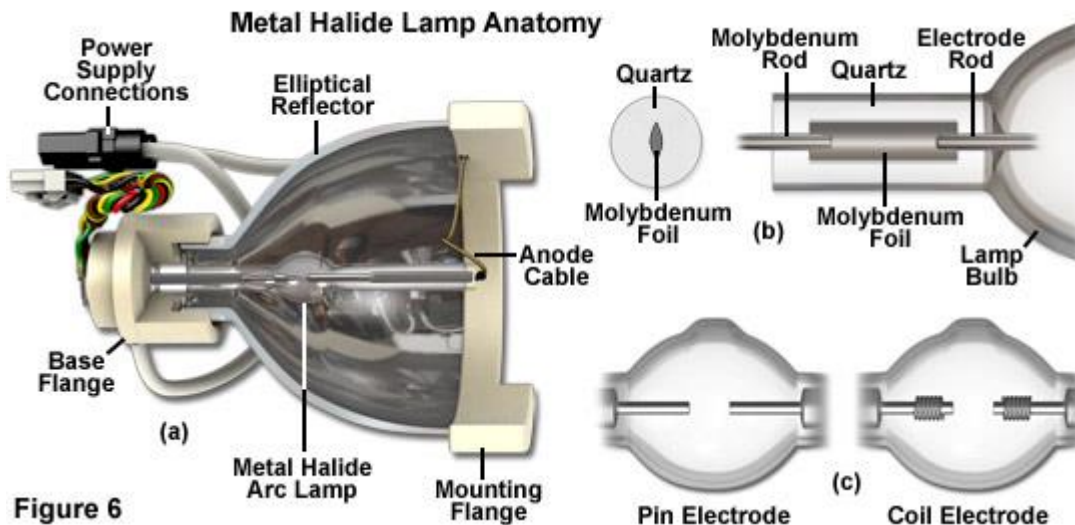
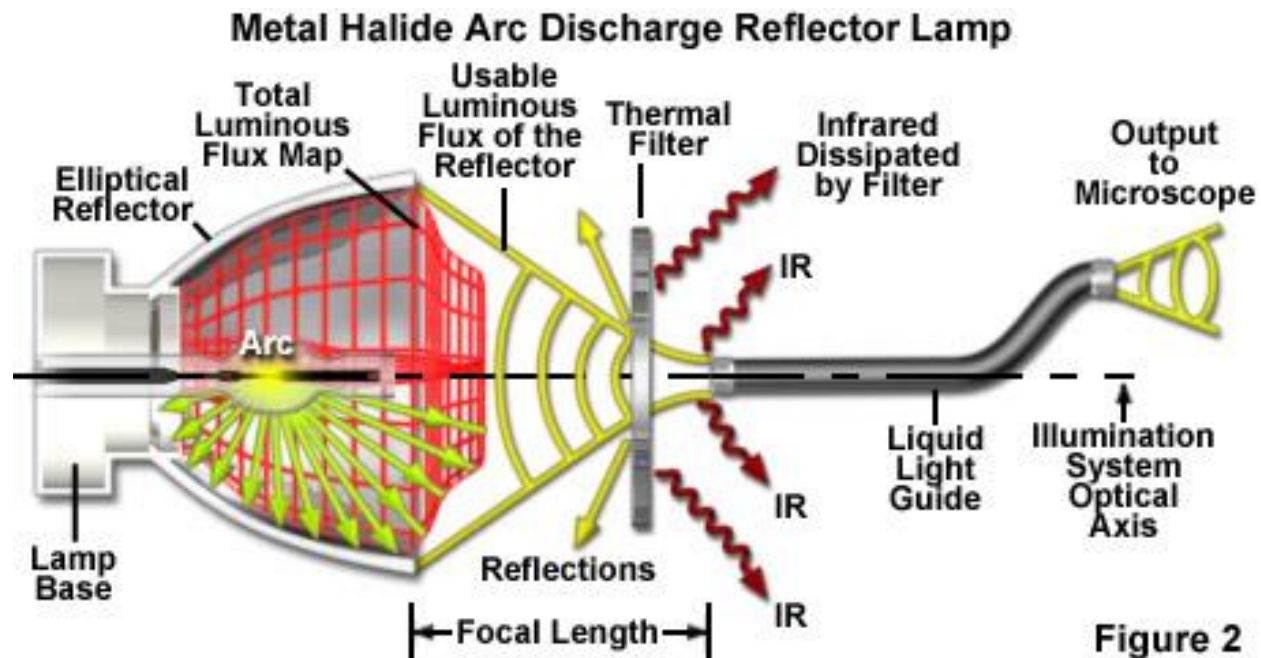
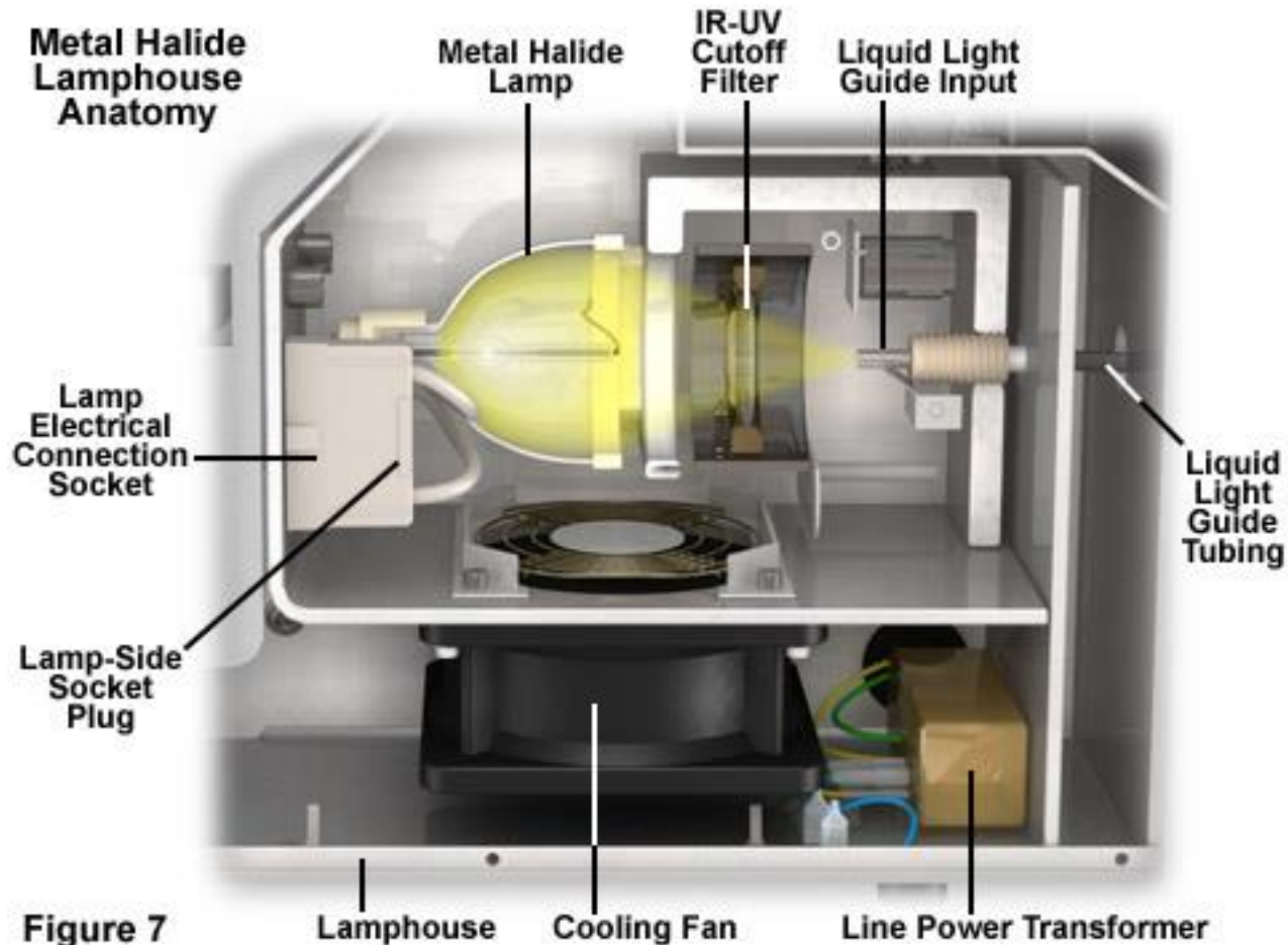
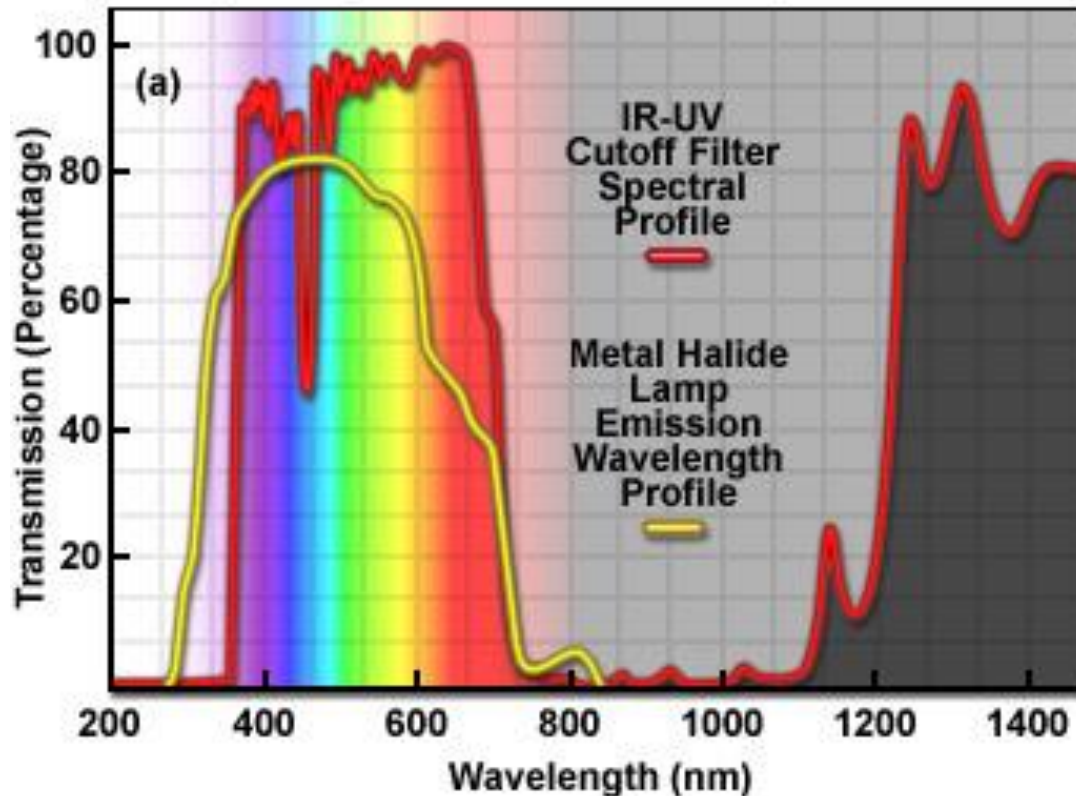
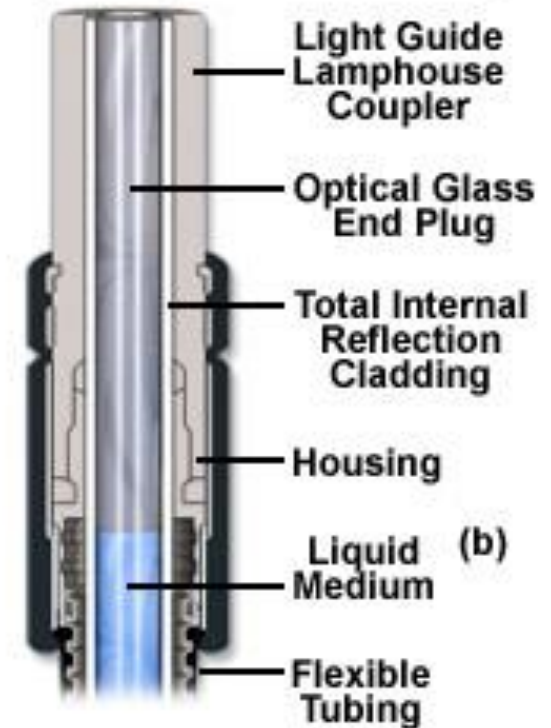
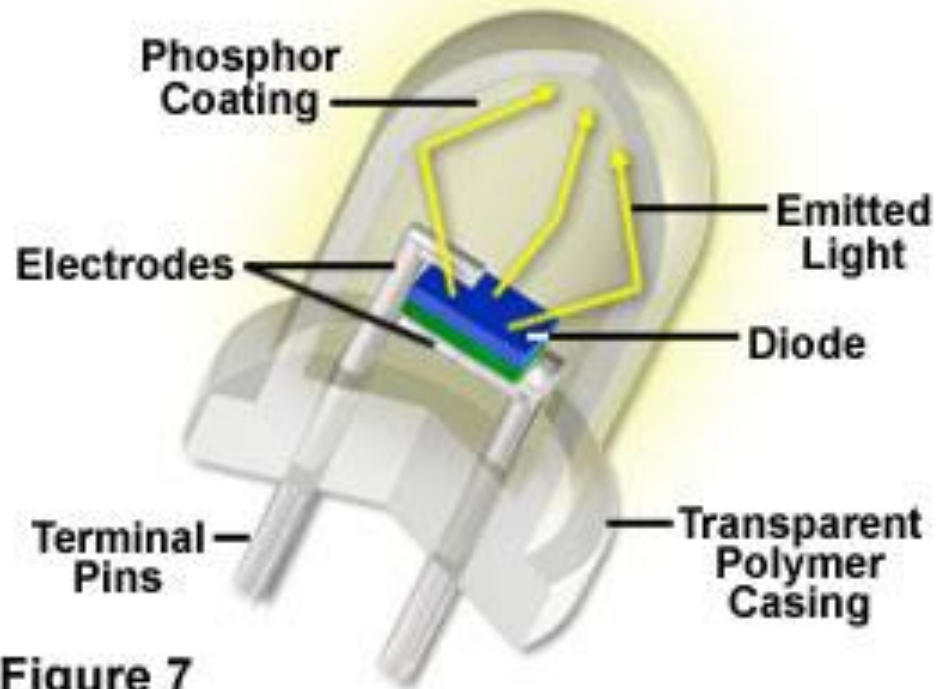
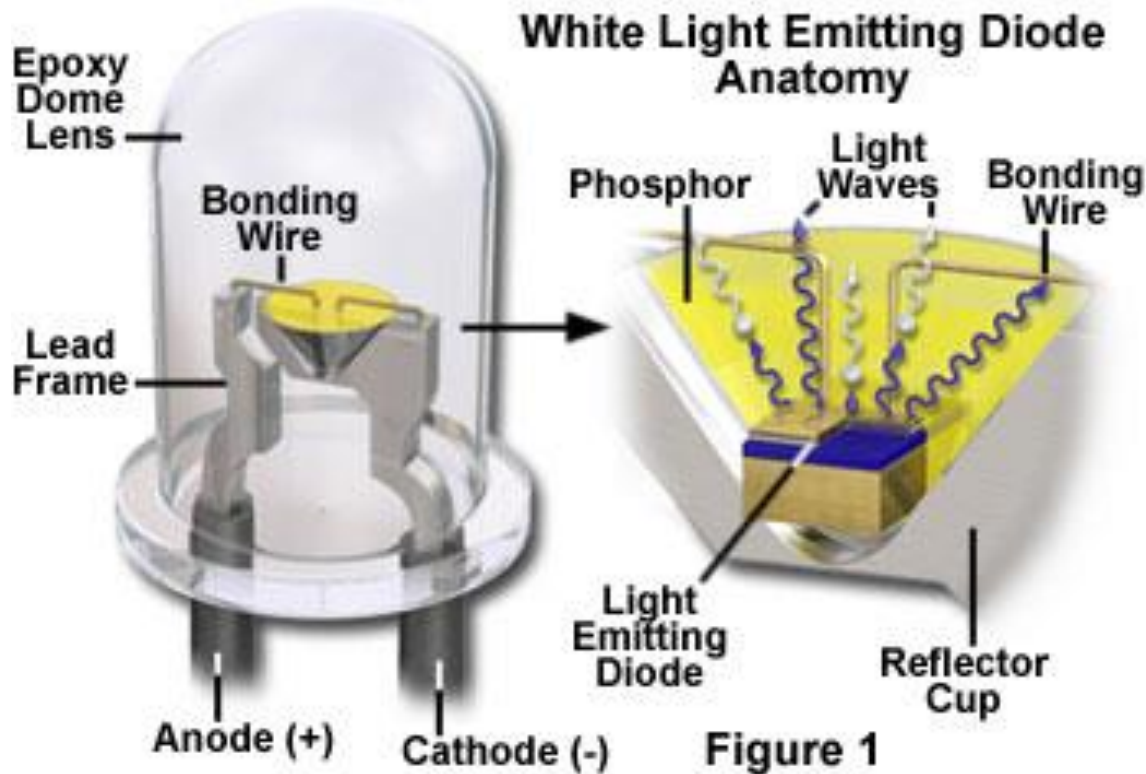
Segurança na Operação: Quando ligadas, geram pressão interna elevada e devem ser tratadas com EXTREMO cuidado. A pressão e portanto risco de quebra persistem em lâmpadas de Xe, mesmo quando frias. Cuidado com radiação UV e calor durante operação e manutenção.

****** Devido à alta voltagem necessária para acionar as lâmpadas, quantidades importantes de radiação de rádio-freqüência são geradas que podem interferir com equipamentos sensíveis como **computadores.**

Lâmpadas de Haletos metálicos- *metal halide*

- **Substitutas das HBOs**
- **Necessitam fibra aquosa para transporte**
- **Duração de 2000 h x 200 de HBO**
- **Custo**: aprox. US$ 2/hora de uso, ~2000 horas de uso.
- **Seguras; admitem filtros de excitação no caminho óptico**

Metais e Haletos

- Elementos utilizados: Terras raras, **lantanídeos** **Disprósio** (**Dy**) (do grego "*dysprositos*", difícil de obter, **Túlio** (**Tm**) (a cidade mítica de Thule) e/ou **Hólmio** (**Ho**) a designação latinizada da cidade de Estocolmo, cidade natal de um dos seus descobridores .
- Assim como nas lâmpadas de W, há uma camada de Haletos (Br, F) nas paredes internas que regeneram os metais.

Lâmpadas de Haletos metálicos- *metal halide*
Espectro x HBO

Lâmpadas de Haletos metálicos- *metal halide*

Housing das Lâmpadas de Haletos metálicos

Guia para luz, com meio líquido

Light Emmiting Diodes: LEDs

- LEDs têm baixo consumo de energia, 1 a 3 volts a 10 - 100 miliamperes), longa vida útil, sendo portanto excelentes fontes de luz branca para microscopia.

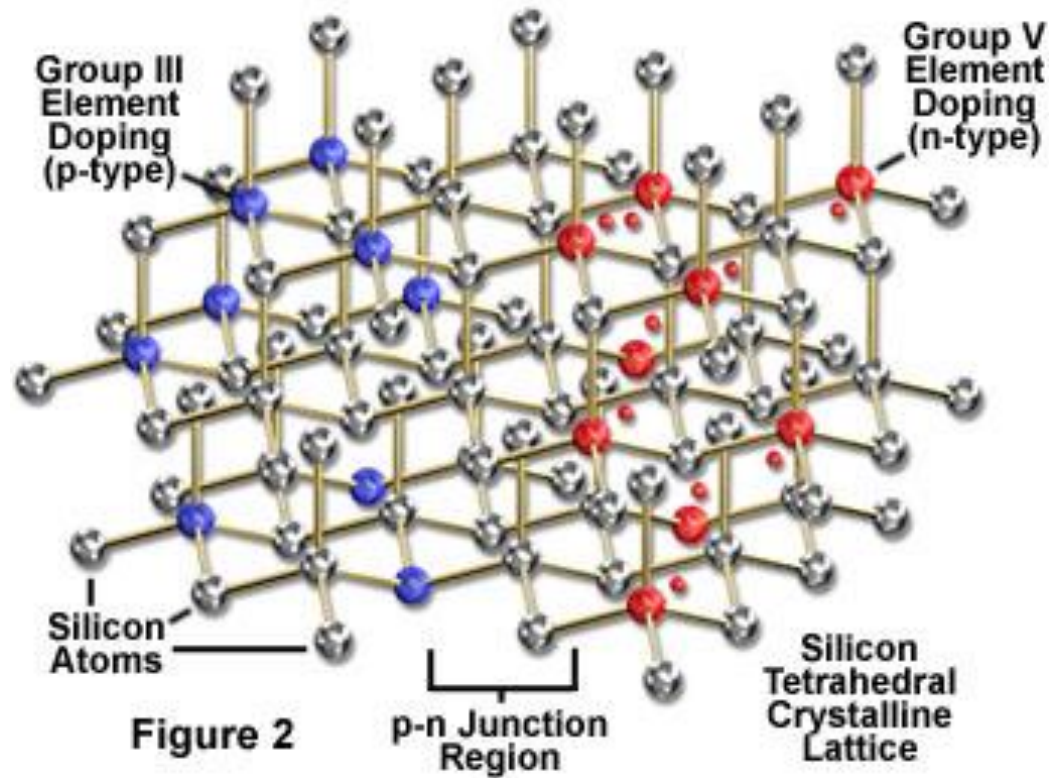
LEDs

- Lâmpadas incandescentes estão em uso há mais de 100 anos e persiste essencialmente como foi criada. Fonógrafo, gravador de fita, VHS, mimeógrafos foram substituídos por sistemas digitalizados.

- LEDs vermelhos e verdes existem em equipamentos eletrônicos há 20 anos e, nos anos 90, foram desenvolvidos LEDs azuis (Nobel-2014) e brancos.

- LEDs mais potentes e que emitem em diferentes λ têm sido produzidos em crescimento vertiginoso.
- LEDs já estão substituindo as lâmpadas incandescentes.

- Aprox. 10% dos semáforos vermelhos nos EUA foram trocados por LEDs vermelhas. Seu custo inicial se paga em 1 ano – uma lâmpada LED de 10-25 W pode ser usada no lugar de uma de 50-150W, que necessita ainda filtro vermelho.

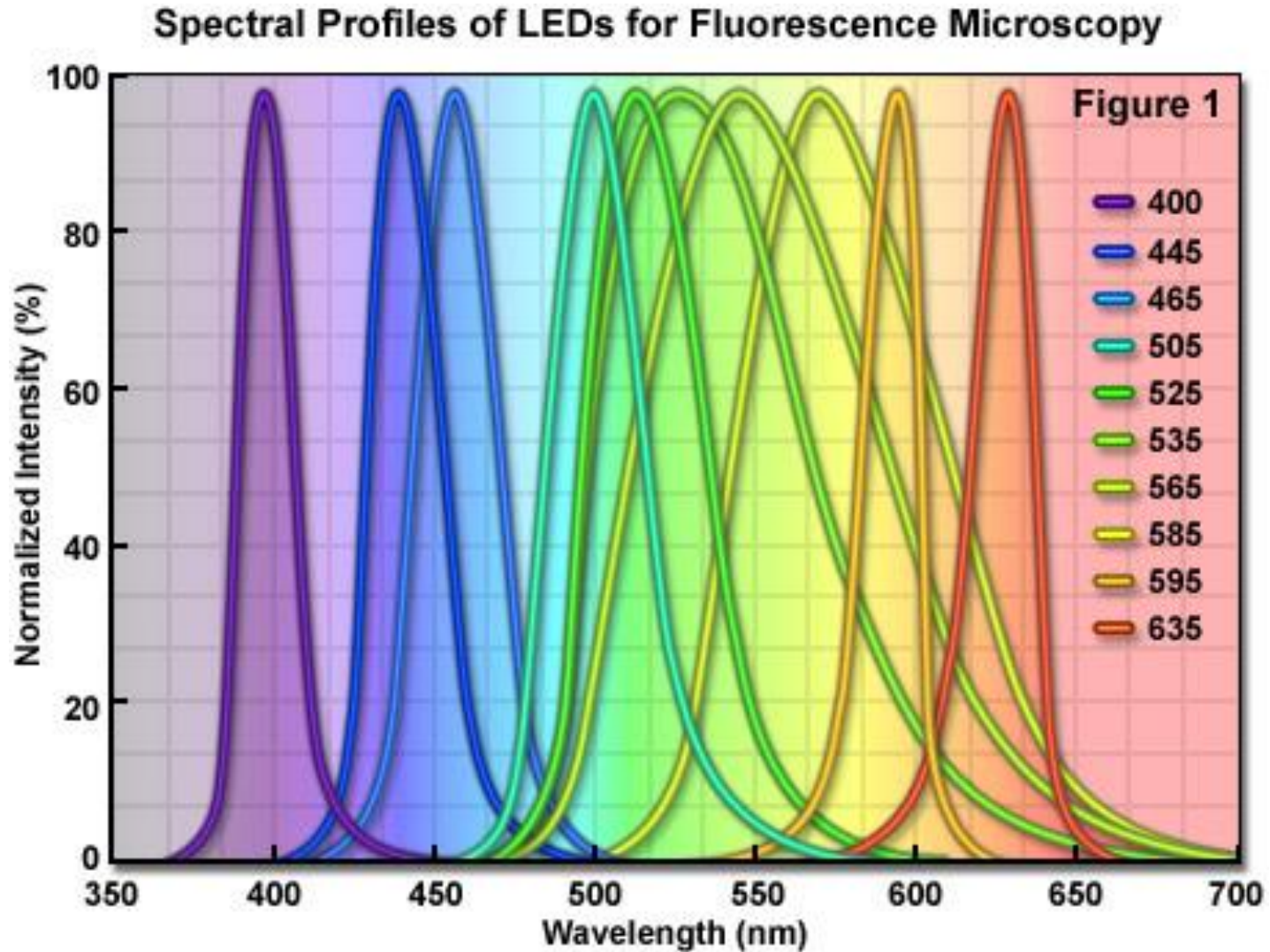
- A longevidade dos LEDs tem levado à sua utilização em aeroportos, iluminação pública, etc.. No Brasil, a substituição é acelerada também.

O LED básico consiste de uma **junção** entre 2 materiais semi-condutores diferentes **n e p.** Quando uma voltagem suficiente é aplicada, produz uma corrente e cargas **negativas e positivas** são recombinadas num processo acompanhado de **emissão de luz**.

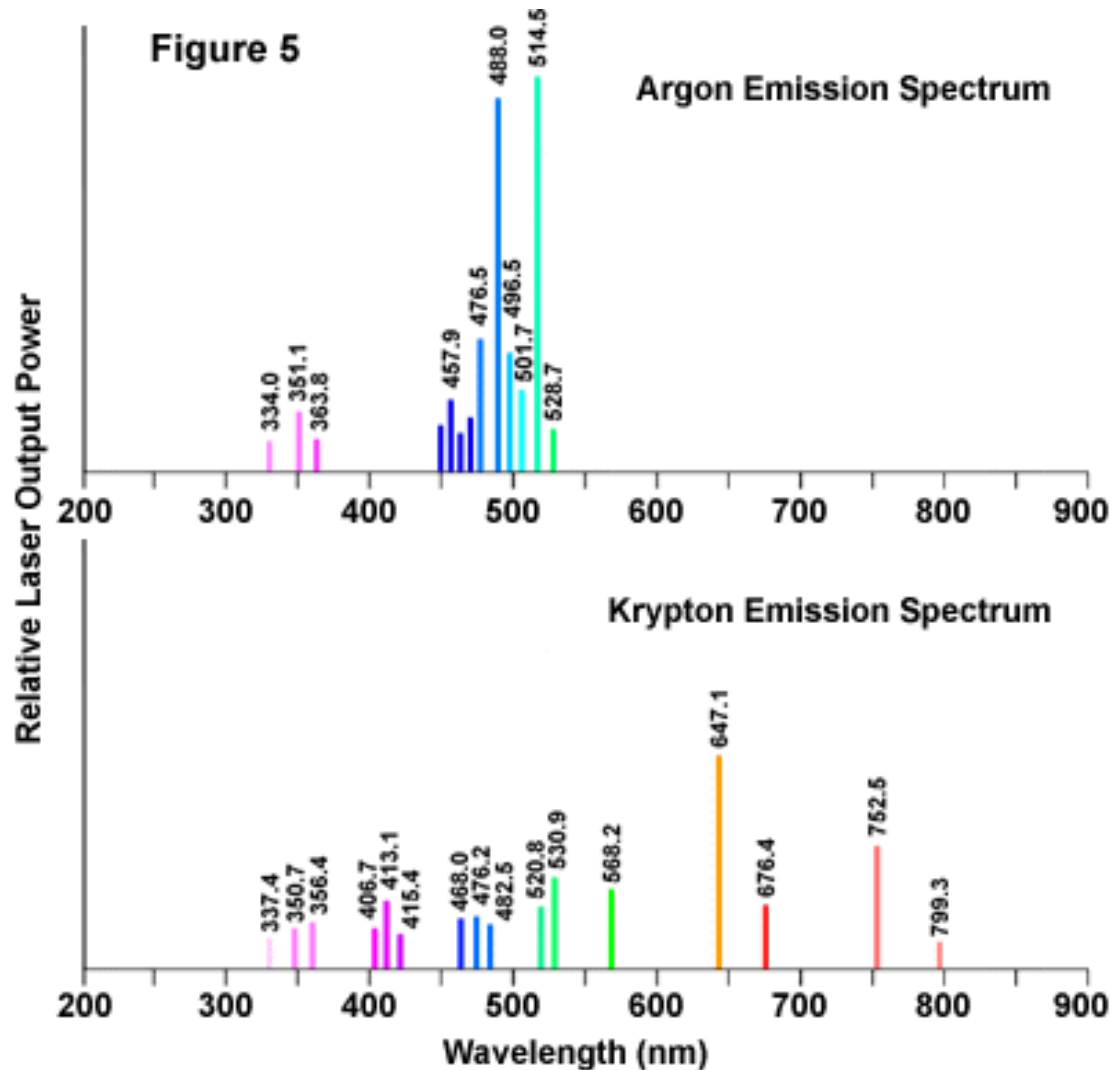
- O elemento básico do LED é equivalente a um chip de semicondutor montado sobre uma cápsula refletora apoiadas em conectores de chumbo e envolvidas em uma lente de epoxi rígido.
- Uma das 2 regiões semicondutoras que contém a junção entre os 2 elementos é dominada por cargas negativas (**n-type** region), a outra, por cargas positivas (**p-type** region).
- Quando suficiente voltagem é aplicada às conexões, fluem elétrons (corrente) através da junção de **n** para **p,** onde os elétrons (-) combinam-se com cargas positivas.
- Cada evento é associado com uma redução de energia que pode liberar um *quantum* de energia eletromagnética na forma de **fóton**. A frequência e cor dos fótons emitidos é característica do material do semicondutor, e diferentes cores podem ser geradas alterando-se a composição do semi-condutor do chip.

http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/leds/basicoperation/index.html

Light Emitting Diode Color Variations

Color Name	Wavelength (Nanometers)	Semiconductor Composition
Infrared	880	GaAlAs/GaAs
Ultra Red	660	GaAlAs/GaAlAs
Super Red	633	AlGaInP
Super Orange	612	AlGaInP
Orange	605	GaAsP/GaP
Yellow	585	GaAsP/GaP
Incandescent White	4500K (CT)	InGaN/SiC
Pale White	6500K (CT)	InGaN/SiC
Cool White	8000K (CT)	InGaN/SiC
Pure Green	555	GaP/GaP
Super Blue	470	GaN/SiC
Blue Violet	430	GaN/SiC
Ultraviolet	395	InGaN/SiC

LEDs em fluorescência

Laseres

(light **a**mplification by **s**timulated **e**mission of **r**adiation**)**

Princípio de geração de luz: um feixe de alta qualidade é gerado pela estimulação de átomos de material adequado numa cavidade laser.
Esta consiste num tubo selado contendo o material a ser excitado que por sua vez é excitado por outro laser, um lâmpada de flash ou uma fonte de alta voltagem seguida de um controle cuidadoso de corrente constante.

Nestas condições, podem ocorrer:

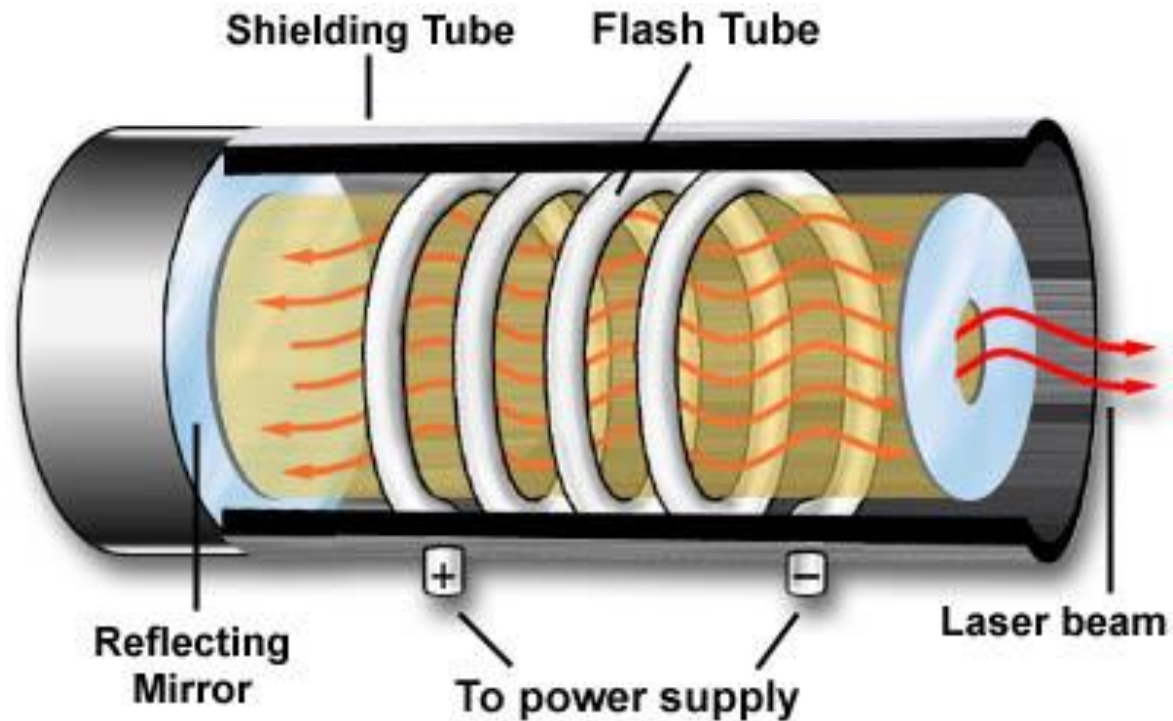
- absorção,
- emissão espontânea e
- **emissão estimulada**

- Para emissão estimulada um átomo excitado deve colidir com um fóton de alta energia e então vai emitir outro fóton de mesma polarização, fase e frequência (ou mesmo λ).

- Além disso, a emissão estimulada deve se sobrepor à absorção e emissão espontânea se a população de átomos em estado excitado for majoritária. Isto resulta numa amplificação da luz original.

- A chave da eficiência dos laseres é garantir que emissão estimulada se sobreponha aos 2 outros fenômenos.

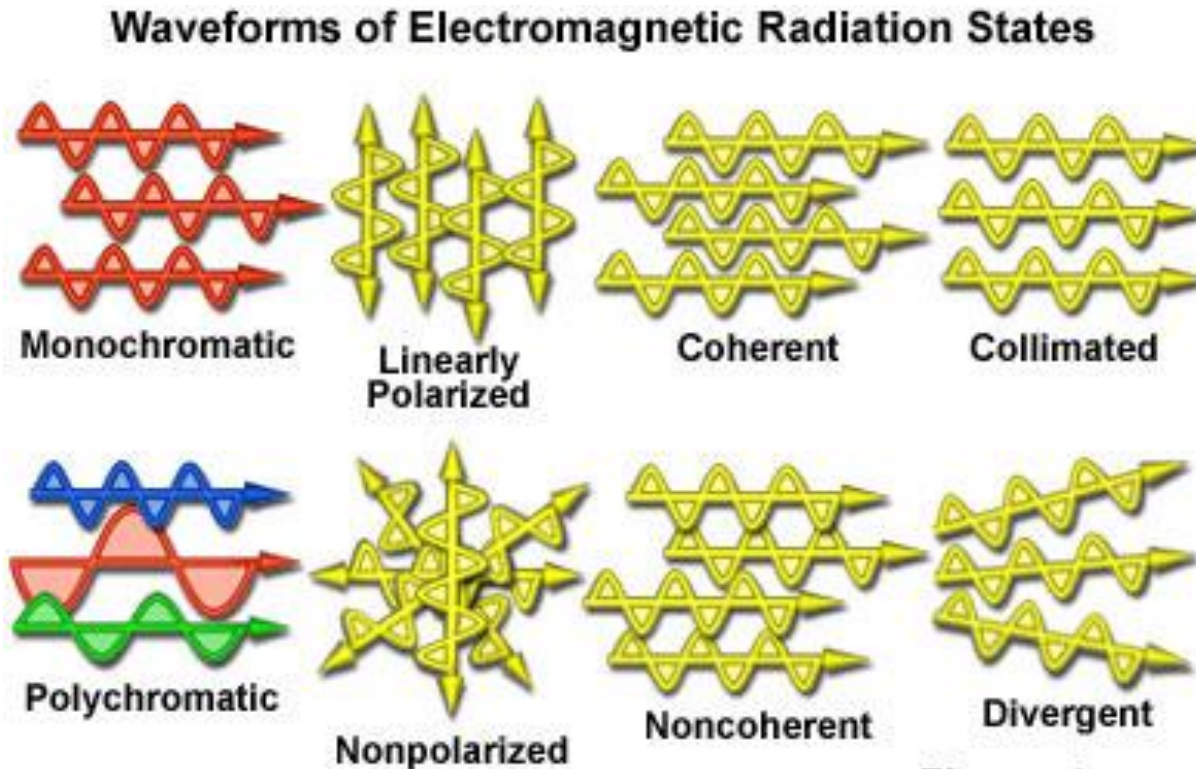
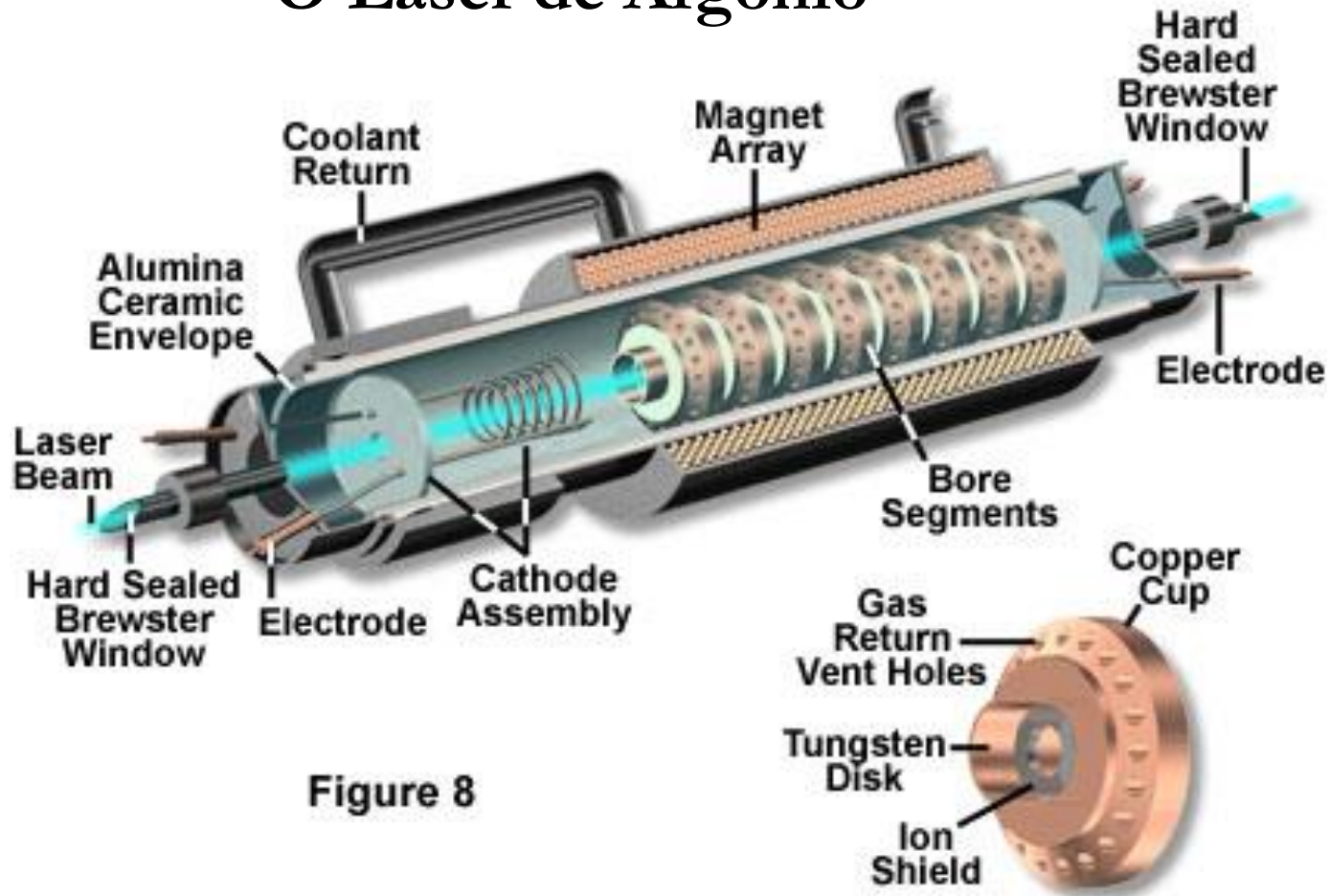
- Numa das **extremidades** da cavidade há um espelho altamente refletivo e no outro um refletor com transmissão parcial e um orifício para saída do feixe.

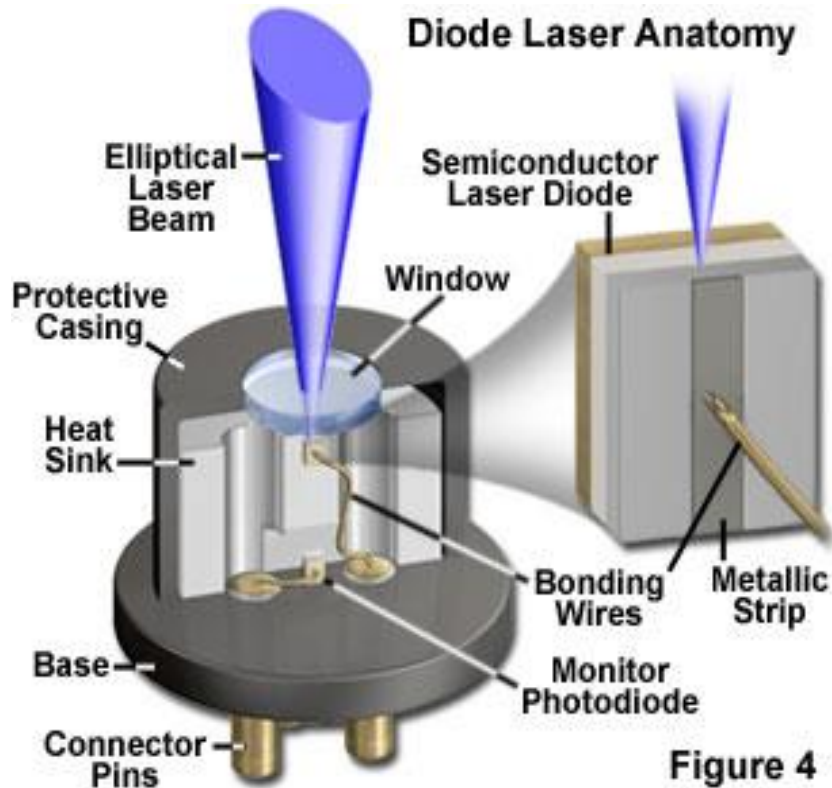
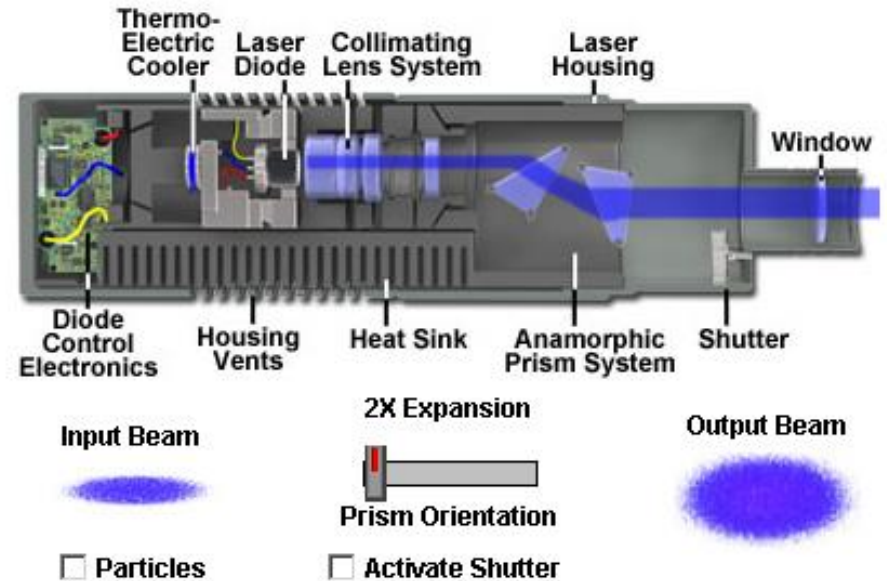
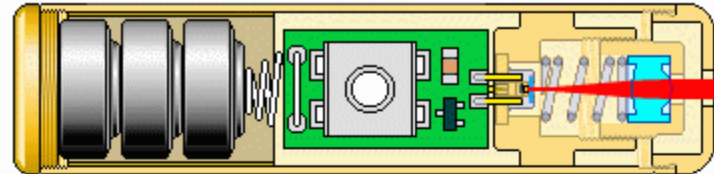
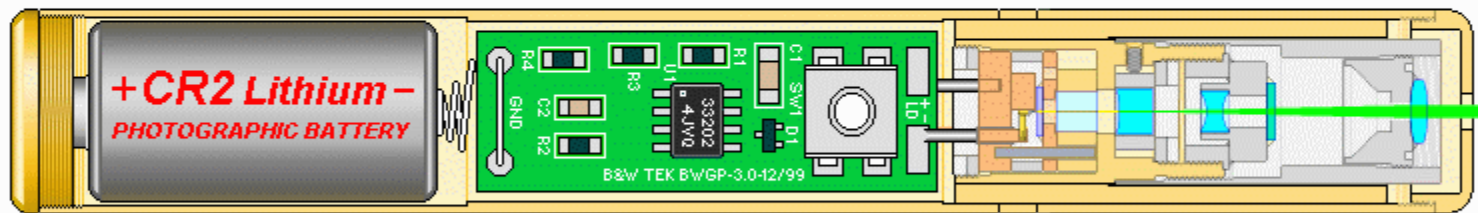
http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/lasers/simplelaser/index.html

Qualidade do feixe de luz: laseres são desenhados para satisfazer uma necessidade simples: intensidade:

- Isto é conseguido por que o feixe é **colimado** (i.e. os raios de luz são virtualmente paralelos). Isto é possível porque a frente de onda emergindo do laser é virtualmente plana (ie, todos os pontos através do feixe estão em fase ou são **coerentes**).
- Além da coerência espacial, os laseres têm alto grau de coerência temporal, ie, uma fase constante em cada parte do feixe.

Formatos de ondas (radiação) eletromagnéticas

O Laser de Argônio

http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/lasers/argonionlaser/index.html

O Laser de Diodo: 405nm e 561nm

http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/lasers/diodelasers/index.html

Apontadores Laser de Diodo:
635 nm e 520 nm

http://www.repairfaq.org/sam/laserstr.htm

Estabilidade e confiabilidade: depende de diversos fatores: manutenção, alinhamento, sofisticação dos controles, e deterioração natural dos componentes. Manutenção de temperatura e resfriamento após término da operação (Ar/Kr, pelo menos 15 minutos. Não se deve ligar/desligar c/ frequência.

Brilho: Qualidade do feixe permitem excelente iluminação pontual, de alta intensidade.

Custos: iniciais entre US$ 1 a US$ 10 por hora. Recondicionar o tubo e re-alinhar podem resultar em 60% to custo de um laser novo.